

活性氧自由基在 ARDS 发病机制中作用的实验研究

刘和亮, 赵金垣

(北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083)

摘要: 目的 探讨活性氧(ROS)自由基在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发病机制中的作用。方法 采用电子自旋共振(ESR)技术直接测量 ROS, 并结合超微弱发光法、化学发光法等技术分析鉴定了 ROS 的种类。结果 ESR 结果显示, 大鼠注射 OA 后 10 min ROS 含量即升高, 30 min 达到高峰, 以后逐渐下降; 利用超微弱发光法, 投用不同 ROS 的清除剂得出 OA 型 ARDS 发病中起主要作用的 ROS 是超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), 而化学发光法定量检测结果与 ESR 波谱显示的结果完全一致。结论 ROS 的改变早于肺毛细血管内皮(PCEC)损伤和病理形态的发生, ROS 可能是 ARDS 启动的主要病因; OA 型 ARDS 发病中起主要作用的 ROS 是 $O_2^{\cdot-}$, 今后在临床上可针对性应用 SOD 或 SOD 类似物来进行治疗。

关键词: 活性氧; 急性呼吸窘迫综合征; 电子自旋共振; 超微弱发光法

中图分类号: O611.62; O623.424; R563.8 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)02-0072-04

Experimental study of reactive oxygen species in the pathogenesis of ARDS

LIU He-liang, ZHAO Jin-yuan

(Research Center of Occupational Medicine, The Third Clinical Hospital of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of reactive oxygen species (ROS) in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Method** ROS was measured by electron spin resonance (ESR) directly and the species of ROS were identified and quantified by the ultra-weak luminescence and chemical luminescence. **Result** The spectrum of ESR showed that the concentration of ROS increased at 10 minutes and got summit at 30 minutes after injection of oleic acid (OA), then dropped gradually; the scavenging effect of different scavenging agent to ROS in the experiment of ultra-weak luminescence proved that superoxide anion play an important role in the development of ARDS induced by chemicals. moreover, the results of quantified measure to superoxide anion by chemical luminescence corresponded with the tendency exhibited in ESR measurement. **Conclusion** The results demonstrated that the change of ROS was earlier than that of pulmonary capillary endothelial cells (PCEC) and pathophysiological change. ROS may be a key factor in the starting phase of ARDS and superoxide anion may be a leading actor in the action of ROS. It would be helpful to use superoxide dismutase (SOD) and the analog of SOD in the future clinical treatment of ARDS because SOD is the special scavenging agent to superoxide anion.

Key words: Reactive oxygen species; Acute respiratory distress syndrome; Electron spin resonance; Ultra-weak luminescence

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基是氧化应激的重要病因, 在许多肺疾患尤其在急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的发生发展过程中具有重要作用^[1,2]。

近年来, 虽然已有许多 ARDS 的研究涉及到 ROS^[3,4], 但尚未见直接分析其种类及变化规律的报告。本研究利用电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 技术直接测量 ROS, 并结合超微弱发光法、化学发光法等技术分析鉴定了 ROS 的种类, 为研究 ARDS 的发病机制和防治开辟了一个新的窗口, 现报告如下。

收稿日期: 2002-12-25; 修回日期: 2003-02-18

基金项目: 国家自然科学基金课题 (编号: 30170799); 国家教育部博士点基金课题 (编号: 20010001092)

作者简介: 刘和亮 (1968-), 男, 河北唐山人, 副教授, 博士研究生。

1 材料和方法

1.1 化学性 ARDS 动物模型制备及实验分组

健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量 240 ~ 280 g (北京大学医学部实验动物中心提供), 随机分为健康对照组和 ARDS 实验组。实验组大鼠腹腔注射质量分数 25% 乌拉坦 (1.2 g/kg 体质量) 麻醉, 随后经股静脉注射油酸 (OA, 化学纯, 北京金龙化学试剂有限公司), 剂量为 0.15 ml/kg 体质量, 根据观察时间不同共分为 10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h 等 6 个亚组; 对照组大鼠麻醉后注射等量生理盐水 (每组各 5 只大鼠)。在微弱发光法实验中, 为排除 OA 本身的作用, 特设定 OA 对照组和正常组。ARDS 模型是否成功由动脉血气分析及病理学观察验证。

1.2 样品的采集

实验组大鼠按不同亚组分别于股静脉注射 OA 后 10 min、30 min 及 1 h、2 h、4 h 和 6 h 在多道生理记

记录仪监控下经右颈外静脉作肺动脉插管,同时通过左颈动脉作左心室插管;记录肺动脉压和心室压。之后分别采集肺动脉血、左心室血及股静脉血;其中采集颈动脉血 0.5 ml 在 NOVA Stat Profile 3 型血气分析仪上作血气分析;最后打开胸腔,取出肺组织,留待 ROS 测定。各样品测定方法如下。

1.3 肺组织 ROS 的 ESR 测定

试剂: *N*-特丁基- α -苯硝酮 (*N*-tert-butyl- α -phenyl-nitron, PBN, 美国 Sigma 公司), 二乙三胺五乙酸 (diethylenetriamine pentaacetic acid, DETAPAC), 乙酸乙酯 (分析纯, 北京化工厂)。捕集剂配制: 100 mmol PBN, 2 mmol/L DETAPAC 溶于 pH 7.4 的 PBS 中。

取 2 g 肺组织, 加 1 ml 捕集剂, 电动匀浆 2 min, 取出后加入 0.6 ml 乙酸乙酯, 14 000 r/min 离心 10 min (或 15 000 r/min, 5 min)。将上层乙酸乙酯分离液移入试管内, 0~4 °C 保存, 2 h 内检测。

ROS 测定: 使用 Varian E-109 E ESR 波谱仪。检测条件: 中心磁场 3 445 G, X 波段, 微波功率 20 mW, 调制 100 kHz, 调制幅度 2.5 G, 扫宽 200 G, 时间常数 0.128, 室温记录波谱, 用 ESR 峰高表示 ROS 相对浓度。

1.4 微弱发光法测量肺内自由基时间动力曲线并鉴定自由基种类

BPCL 微弱发光测量仪 (Ultra-Weak Luminescence Analyzer, 中科院生物物理所), 测量参数为时间 1 200

s, 间隔 1.00 s, 光源 7 000, 高压 980, 噪声 10。以最能代表肺内状况的 10 μ l 左心室血清 (或 OA 稀释液) 加入 1 ml 双蒸水中, 放入发光管中跑 1 min 基线后开始测量。后分别添加超氧化物歧化酶 (SOD, 中科院上海生物化学所)、过氧化氢酶 (CAT, 中科院上海生物化学所)、无水乙醇 (分析纯, 北京化工厂) 等各 10 μ l, 测量各自不同的时间动力曲线。

1.5 化学发光法测定超氧阴离子

仪器: WDD-1 型发光测试仪 (北京第二光学仪器厂)。试剂: 碳酸缓冲液, pH=10, 0.1 mol/L; 发光液 (Luminol, 10 mmol Luminol 贮备液冷藏保存, 用时稀释 100 倍)。操作过程: 顺序加入邻苯三酚 10 μ l、4 mol/L NaOH 80 μ l、Luminol 900 μ l, 血清样品 10 μ l, 混合后检测, 记录读数。

1.6 统计学分析

数据经 SPSS 10.0 软件程序处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组别、不同取血途径数值比较采用方差分析; 采用 Macrocal Origin 6.0 软件作图。

2 结果

2.1 动脉血气分析结果

ARDS 各组大鼠动脉血 PaO₂ 均显著低于对照组, 其中 2 h 组最低, 动脉血氧合指数 (PaO₂/FiO₂) 符合 1992 年欧美联席会议建议的 ARDS 诊断标准 (200 mmHg) (表 1), 提示 ARDS 动物模型建立成功。

2.2 肺组织中 ROS 测定

表 1 各组实验大鼠血气分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PaO ₂ (mmHg)	CO ₂ (mmHg)	pH	O ₂ Sat (%)	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)
对照组 (control)	5	94.63 $\pm$ 5.85	41.58 $\pm$ 2.52	7.36 $\pm$ 0.03	96.99 $\pm$ 0.51	452.79 $\pm$ 27.99
ARDS 组 10 min	5	70.73 $\pm$ 3.92**	50.65 $\pm$ 5.03*	7.27 $\pm$ 0.06*	90.68 $\pm$ 2.75	338.40 $\pm$ 18.77**
30 min	5	54.10 $\pm$ 2.83**	40.33 $\pm$ 1.91	7.20 $\pm$ 0.12**	79.83 $\pm$ 5.30**	258.85 $\pm$ 13.56**
1 h	5	50.34 $\pm$ 7.34**	52.96 $\pm$ 7.84**	7.26 $\pm$ 0.06**	77.76 $\pm$ 6.99**	240.87 $\pm$ 35.12**
2 h	5	35.08 $\pm$ 4.59**	50.25 $\pm$ 11.09*	7.23 $\pm$ 9.85**	55.80 $\pm$ 12.76**	167.86 $\pm$ 21.94**
4 h	5	45.30 $\pm$ 7.94**	42.30 $\pm$ 5.49	7.33 $\pm$ 0.09	76.30 $\pm$ 8.78**	216.75 $\pm$ 37.97**
6 h	5	63.34 $\pm$ 5.33**	45.17 $\pm$ 9.67	7.36 $\pm$ 0.06	90.59 $\pm$ 2.88*	303.08 $\pm$ 25.51**

与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

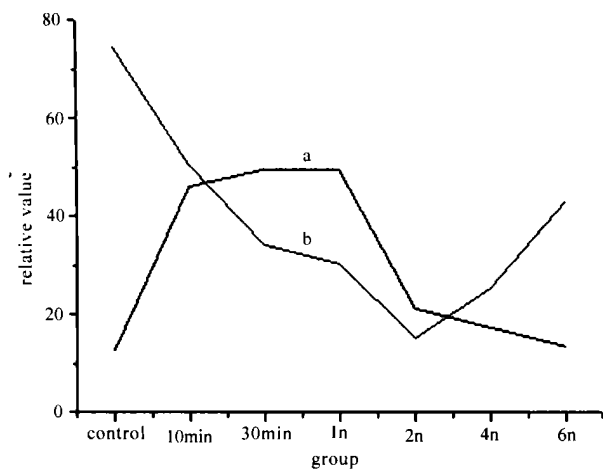
不同条件下 ARDS 大鼠肺组织 ESR 波谱测定结果见图 1 (见第 69 页图 1 中对照组和 ARDS 组波谱图, 此处略)。

如图 1 所示, 正常肺组织几乎没有 ROS 信号, 注射 OA 后肺组织中 ROS 的含量早期即显著升高, 30 min 达到最高, 以后逐渐下降, 到 6 h 已接近正常。图 2 为 ESR 波谱相对高度与 ARDS 大鼠动脉血气分析变化 (以 PaO₂ 值代表血气变化, 各值减去 20 以便与

前者比较) 的比较, ROS 在 30 min 即明显升高, 2 h 明显下降, 而大鼠动脉 PaO₂ 值在 2 h 降到最低点, 表明 ROS 的变化先于 ARDS 的病理生理改变, 提示 ROS 与 ARDS 的发生密切相关并可能是 ARDS 发病的启动病因。

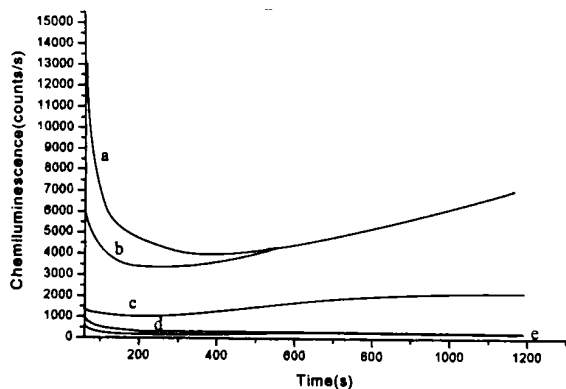
2.3 超微弱发光法测量肺内自由基时间动力曲线及自由基种类

由图 3 可见大鼠注射 OA 后 10 min、30 min 的自



a —— ESR 相对高度; b —— PaO_2 值 (各值减去 20)

图2 ESR 波谱相对高度与 ARDS 大鼠血气变化 (PaO_2 值) 的比较



a —— 注射 OA 后 30 min; b —— 注射 OA 后 10 min; c —— 正常组; d —— 对照组; e —— OA 对照组

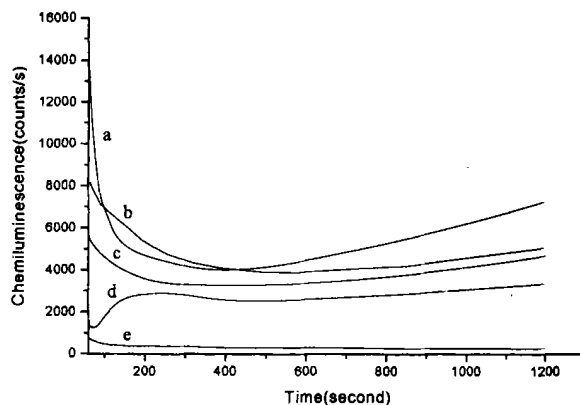
图3 注射 OA 后 10 min、30 min ARDS 大鼠肺内 ROS 化学发光时间动力曲线

由基时间动力曲线显著高于正常组、对照组和 OA 对照组。图 4 为注射 OA 后给不同的自由基清除剂的时间动力曲线, 可见给 SOD 后曲线下降最为明显。SOD 是超氧阴离子的特异清除剂, 提示 OA 型 ARDS 大鼠肺内自由基种类可能主要是超氧阴离子 (O_2^-)。

2.4 化学发光法定量测定超氧阴离子 (O_2^-)

图 4 已提示 OA 型 ARDS 大鼠肺内自由基主要为超氧阴离子, 再用化学发光法进行直接定量测定, 结果见表 2 (见第 69 页表 2 中对照组和 ARDS 组测定结果, 此处略)。由表 2 可见, 注射 OA 后 O_2^- 含量显著升高, 至 30 min 最高, 之后逐渐下降, 与 ESR 波谱显示的结果完全一致。另外, 不同取血途径结果比较显示, 10 min 至 4 h 组左心室显著高于其他途径; 1 h、2 h 和 4 h 肺动脉和股静脉取血途径间差异显著;

至 6 h 左心室仍显著高于股静脉血, 见图 5 (见第 70 页图 2, 此处略), 提示直接采集左心室血最能反映肺内 ROS 的实际状况。



a —— 注射 OA 后 30 min; b —— OA + CAT; c —— OA + 乙醇; d —— OA + SOD; e —— 对照组

图4 不同自由基清除剂对注射 OA 后 ARDS 大鼠肺内 ROS 化学发光时间动力曲线

3 讨论

ROS 是指化学活性远高于基态氧 (O_2) 的某些特殊化学状态或某些含氧化合物, 主要包括氧自由基, 如超氧阴离子、羟自由基等, 也包括各种非自由基含氧物, 如过氧化氢、单线态氧、激发态氧等^[5]。肺是机体进行气体交换的主要场所, 氧化应激在许多肺疾病中的病理发展过程尤其具有重要作用, 其来源主要是肺微循环中出现的激活中性粒细胞, 因它可释放大量的 ROS, 造成组织和细胞损伤^[9]。

ARDS 是临床上常见的急危重症, 也是急性刺激性气体中毒的最严重后果。尽管多年来对其进行了大量的研究, 近年更深入到分子水平, 但始终未能取得重大进展, 其病死率仍居高不下 ($> 50\%$)^[7,8]。究其原因, 发病机制不明为主要障碍。本课题组自 1992 年以来一直致力于 ARDS 的研究, 结果显示, 肺毛细血管内皮细胞 (pulmonary capillary endothelial cells, PCEC) 损伤并进而引起肺微循环障碍可能是引起 ARDS 发生发展的病理学基础; 研究还初步证实, 启动 PCEC 的关键因素可能是氧化性损伤, 早期采用抗氧化措施可有效防止 ARDS 的病程进展^[9,10], 但氧化应激在肺组织内的发生发展规律还不十分清楚。虽然已有一些研究涉及到 ROS 的研究, 但仍停留在脂质过氧化产物、抗氧化酶测定等一些间接观察上^[11~13], 缺乏生物体系中敏感的直接的实验数据^[14]。ESR 技术系通过电子自旋捕集剂先与自由基形成较为稳定的自旋加合物, 再行检测, 具有捕集及时、直接测定、方法灵敏等特点, 能检

测出 10^{-14} mol 的样品。此外, ESR 方法一般不需对样品进行复杂的处理, 直接拿来检测而不破坏样品, 为生物或化学体系中存在的低浓度自由基测量提供了可能, 是目前检测生化体系中自由基的最佳手段。PBN 是一种含羰基的捕集剂, 能和自由基稳定结合, 一般不产生杂质自由基信号, 捕集氧自由基效率较高, 形成的自旋加合物寿命也较长, 但对自由基的性质不很敏感。ROS 在反应过程中处于激发态, 能释放能量, 产生化学发光, 故可利用高灵敏度的发光仪器进行直接测量^[15]。本研究所用仪器 BPCL 主要用于分析各类弱光发射, 精度可达到光子级, 灵敏度高 ($10 \sim 15 \mu\text{A}/\text{ml}$), 检测范围大 ($200 \sim 700 \text{ nm}$), 但由于 ROS 都可以产生化学发光, 因此可以检测这些 ROS 的产生和存在, 但不能确定是哪一种 ROS。为了确定是哪一种 ROS, 就需要用各种 ROS 的特异清除剂来鉴定自由基的种类, 如用 SOD 判定超氧阴离子, 用乙醇判定羟基自由基, 用 CAT 判定过氧化氢等。而用化学发光法检测 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 由于使用鲁米诺 (luminol) 作为发光增效剂提高了观察的灵敏度, 具有快速、灵敏、定量、操作简便等特点。

本研究以油酸造成的化学性 ARDS 为模型, 并采用 ESR 技术直接检测 ARDS 时肺内自由基生成情况, 用超微弱发光法排除 OA 本身作用, 并通过各种 ROS 的特异清除剂证明了 OA 型 ARDS 大鼠发病中起主要作用的 ROS 是 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 。也有文献报道缺血再灌注造成的肺损伤中给予 SOD 具有预防作用, 而给其他自由基清除剂却无显著效果, 与本研究结论类似^[16, 17]。此外, 应用化学发光法定量比较了不同取血途径 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的差异, 并进一步证实了前面两种方法的研究结果。从上述方法所得结果可以看出: (1) 大鼠注射 OA 后 10 min ROS 含量即升高, 30 min 达到高峰, 而循环内皮细胞脱落高峰在 1 h 后^[9], 动脉血气分析结果显示血氧分压在 2 h 达到低谷, 肺内微血栓的形成更是在 6 h 以后^[18], 可见自由基的改变早于肺毛细血管内皮 (PCEC) 损伤和病理形态的发生。进一步证实了我们先前的假设, 即启动 PCEC 损伤的关键致病因素是氧化性损伤, ROS 可能是 ARDS 启动的主要病因。(2) 本研究利用超微弱发光法, 投用不同 ROS 的清除剂得到 OA 型 ARDS 发病中起主要作用的 ROS 是 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 从而为今后临床有针对性的治疗, 如应用 SOD 或 SOD 类似物提供了理论基础。

由于迄今为止 ARDS 还缺乏有效的治疗手段, 临床仍以支持疗法为主, 本研究揭示的 ROS 在 ARDS 的

发生发展中的重要地位, 对今后 ARDS 发病机制认识的提高及临床有效防治无疑具有重要的实际意义。

(本研究得到中科院生物物理所赵保路教授、张德良博士的大力协助, 在此表示衷心的感谢!)

参考文献:

- [1] MacNee W. Oxidants/antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to therapy [J]. Novartis Found Symp, 2001, 234: 169-185.
- [2] Morcillo EJ, Estera J, Cortijo J, et al. Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants [J]. Pharmacol Res, 1999, 40: 393-404.
- [3] Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction [J]. Intensive Care Med, 2000, 26: 474-476.
- [4] Kumar KV, Rao SM, Gayani R, et al. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS [J]. Clin Chim Acta, 2000, 298: 111-120.
- [5] Specter A. Review: Oxidative stress and disease [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2000, 16 (2): 193-201.
- [6] William MN. Oxidants/antioxidants and COPD [J]. Chest, 2000, 117: 303s-317s.
- [7] Michael A. Matthay. Acute lung injury [J]. Chest, 1999, 116 (1 Suppl): 119s-126s.
- [8] Soubani AO, Pieroni R. Acute respiratory distress syndrome: A Clinical Update [J]. South Med J, 1999, 92 (5): 450-457.
- [9] 刘和亮, 赵金垣. ACEI 对 ARDS 大鼠血管内皮细胞的保护作用研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2002, 35 (1): 5-9.
- [10] 刘和亮, 赵金垣. 甘油果糖注射液对 ARDS 治疗作用研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2001, 2 (1): 9-13.
- [11] Chahot F, Mitchell JA, Gutteridge JMC, et al. Reactive oxygen species in acute lung injury [J]. Eur Respir J, 1998, 11: 745-757.
- [12] Coleman NA. Antioxidants in critical care medicine [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2001, 10: 183-188.
- [13] Metnitz PG, Bartens G, Fischer M, et al. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Intens Care Med, 1999, 20: 180.
- [14] Loeckie LZ, John HNM, Jan NMC, et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26: 202-226.
- [15] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂 [M]. 北京: 科学出版社, 1999, 7.
- [16] Kennedy TP, Rao NV, Hopkins G, et al. Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung [J]. J Clin Invest, 1988, 83: 1326-1335.
- [17] Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, et al. Treatment with N-acetyl cysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double blind placebo controlled clinical study [J]. J Crit Care, 1997, 12: 177-182.
- [18] 刘宏, 赵金垣. 肺循环高凝状态——成人呼吸窘迫综合征的发病机理研究 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 1996, 14 (4): 193.